

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 10 月 9 日 (09.10.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/082917 A1

(51) 国際特許分類: C07K 14/47, C12N
5/12, 5/10, 1/15, 1/19, 1/21, C12Q 1/68

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/00522

(22) 国際出願日: 2003 年 1 月 22 日 (22.01.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-100431 2002 年 4 月 2 日 (02.04.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 理化学研究所 (THE INSTITUTE OF PHYSICAL AND CHEMICAL RESEARCH) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県和光市広沢2番1号 Saitama (JP). 株式会社ダナフォーム (KABUSHIKI KAISHA DNAFORM) [JP/JP]; 〒108-0073 東京都港区三田1丁目3番35号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 林崎 良英

(HAYASHIZAKI, Yoshihide) [JP/JP]; 〒305-0061 茨城県つくば市稲荷前2-1-201 Ibaraki (JP). 鈴木治和 (SUZUKI, Harukazu) [JP/JP]; 〒222-0001 神奈川県横浜市港北区榑町3-6-13 Kanagawa (JP). 金森睦 (KANAMORI, Mutsumi) [JP/JP]; 〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1-7-22 Kanagawa (JP). ハーバーズ マチアス (HARBERS, Matthias) [DE/JP]; 〒108-0073 東京都港区三田一丁目3-35 株式会社ダナフォーム内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 谷川 英次郎 (TANIGAWA, Hidejiro); 〒102-0072 東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号岩田ビル6階 谷川国際特許事務所内 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): CA, US.

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL POLYPEPTIDE AND NUCLEIC ACID ENCODING THE SAME

(54) 発明の名称: 新規ポリペプチド及びそれをコードする核酸

(57) Abstract: It is intended to disclose a novel protein capable of binding to tumor necrosis factor receptor associated factor 2 (TRAF2) and a nucleic acid encoding the same. From a mouse cDNA library, a cDNA encoding a novel protein binding to TRAF2 is found out by a mammalian two-hybrid assay and its base sequence is determined. Also, a protein encoded by the cDNA is produced and experimentally confirmed as binding to TRAF2.

(57) 要約: 腫瘍壊死因子レセプター関連因子2 TRAF2と結合する新規なタンパク質及びそれをコードする核酸が開示されている。マウスcDNAライブラリーから、哺乳動物2-ハイブリッドアッセイ(mammalian two-hybrid assay)により、TRAF2と結合する新規なタンパク質をコードするcDNAを見出し、その塩基配列を決定し、かつ、これによりコードされるタンパク質を生産し、これがTRAF2と結合することを実験的に確認した。

WO 03/082917 A1

明細書

新規ポリペプチド及びそれをコードする核酸

技術分野

本発明は、腫瘍壊死因子レセプター関連因子 2 (TRAF2) と結合する新規なポリ
5 ペプチド及びそれをコードする核酸に関する。

背景技術

腫瘍壊死因子レセプター関連因子 (TRAFs) は、TNF レセプターファミリーを介
したシグナル伝達経路上のアダプタータンパク質であることがわかっている。TR
AF 遺伝子ファミリーは、TRAF1 ないし TRAF6 の 6 種類の遺伝子から成り、各タン
10 パク質のカルボキシ末端の保存された TRAF ドメインにより特徴付けられる (1-5)。
TRAF ファミリーの中で、TRAF2 は、TNF-媒介シグナル伝達経路に包含される。TN
F レセプター 1 (TNFR1) が TNF により刺激されると、TNFR1 が、TRADD (TNFR-関連
死ドメインタンパク質 (TNFR-associated death domain protein) のアミノ末端を
介して間接的に TRAF2 を集める (6, 7)。活性化された TRAF2 は、NF- κ B 及び AP-1
15 の活性化を媒介する RIP (8, 9) 及び ASK1 (10) を包含する数種類のタンパク質を集
め、その結果、細胞性又は免疫性の機能を有する多くの遺伝子が誘導される (11,
12)。TRAF2 の相互作用に加え、TRADD はまた、death ドメインを有するアダプタ
ー分子である FADD と相互作用する (13)。FADD は、細胞死プロテアーゼカスケー
ドの開始プロテアーゼであるキャスパーゼ (caspase)-8 を集めて活性化し、アポ
20 トーシスを引き起こす (14)。従って、TRAF2 は、TNF-媒介細胞生存において鍵と
なる分子であり、ここでは種々のタンパク質が TRAF2 との相互作用によってシグ
ナル伝達経路を制御している。

従って、TRAF2 と結合する新規なタンパク質を見出し、特徴付けることは、TN
F-媒介シグナル伝達経路に関与する生理学的及び病理学的過程の理解にとって重
25 要である。また、このようなタンパク質は、TNF-媒介シグナル伝達経路が関与す
る疾病の診断および治療の対象としての用途を有する可能性がある。

従って、本発明の目的は、TRAF2 と結合する新規なタンパク質及びそれをコー
ドする核酸を提供することである。

本願発明者らは、鋭意研究の結果、マウス cDNA ライブラリーから、哺乳動物 2-ハイブリッドアッセイ (mammalian two-hybrid assay) により、TRAF2 と結合する新規なタンパク質をコードする cDNA を見出し、かつ、これによりコードされるタンパク質が TRAF2 と結合することを実験的に確認して本発明を完成した。

すなわち、本発明は、配列表の配列番号 1 に示されるアミノ酸配列の第 1 番目～第 162 番目のアミノ酸配列を有する領域又は該アミノ酸配列において、1～40 個のアミノ酸残基が置換し、欠失し若しくは挿入されたアミノ酸配列を有する領域を含み、TRAF2 との結合能を有するポリペプチドを提供する。また、本発明は、配列表の配列番号 3 に示されるアミノ酸配列の第 1 番目～第 162 番目のアミノ酸配列を有する領域又は該アミノ酸配列において、1～40 個のアミノ酸残基が置換し、欠失し若しくは挿入されたアミノ酸配列を有する領域を含み、TRAF2 との結合能を有するポリペプチドを提供する。さらに、本発明は、上記本発明のポリペプチドをコードする核酸を提供する。さらに、本発明は、上記本発明の核酸を含み、宿主細胞中で該核酸を発現することができる発現ベクターを提供する。さらに、本発明は、上記本発明の核酸が導入された細胞であって、上記本発明のポリペプチドを発現する細胞を提供する。さらに、本発明は、上記本発明の核酸とハイブリダイズする核酸であって、上記本発明の核酸の検出に用いることができる核酸を提供する。さらに本発明は、該検出用核酸をプローブ又はプライマーとして用いて上記本発明の核酸を測定する方法を提供する。

本発明により、TRAF2 と結合する新規なポリペプチド及びそれをコードする核酸が初めて提供された。本発明のポリペプチドは、TRAF2 と結合するので、TRAF2 が介在するシグナル伝達の研究において重要である。また、本発明のポリペプチドは、NF- κ B シグナルを活性化させ、それが TNF を介した伝達であることが示唆されることから、その機能を阻害することにより、NF- κ B シグナルを減弱させることが可能である。よって、NF- κ B シグナルが関与する疾患として炎症、リウマチなどの治療薬開発のためのターゲットとして有用である。また、NF- κ B シグナルは破骨細胞の活性化にも関与しているので、骨そしょう症治療薬開発の

ためのターゲットとしても有用である。

図面の簡単な説明

図 1 の A は、哺乳動物 2 - ハイブリッド法の結果を示し、B は、ヒト及びマウス T2BP のアミノ酸配列を比較して示す図である。

5 図 2 の A は、TRAF2 及びその欠失変異体を模式的に示すもの並びにそれらと野生型 T2BP との相互作用を示し、B は、T2BP 及びその欠失変異体を模式的に示すもの並びにそれらと野生型 TRAF2 との相互作用を示す。

図 3 は、本発明の実施例で行った、T2BP が TRAF2 と結合することを示す免疫共沈降の結果を示す図である。

10 図 4 は、本発明の実施例で行った、各種組織中の T2BP の発現を示す、ノーザンブロット分析の結果を示す図である。

図 5 は、本発明の実施例で行った、T2BP をトランスフェクトした 293 細胞中での NF- κ B 及び AP-1 の活性化を示す、T2BP 量と相対ルシフェラーゼ活性の関係を示す図である。

15 発明を実施するための最良の形態

下記実施例に詳述する方法により、マウス生後 3 日目の胸腺由来の cDNA ライブラリーから、哺乳動物 2 - ハイブリッドアッセイの手法を用いて、TRAF2 と結合する新規なポリペプチドをコードする cDNA を見出した。その塩基配列を、推定アミノ酸配列と共に配列番号 4 に示す。配列番号 3 には、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列のみを取り出して示す。このポリペプチドを、「T2BP」(TRAF 2-binding protein) と命名した。また、BLAST による相同性検索により、ヒトの機能未知遺伝子の中からマウス T2BP cDNA と相同性の高い cDNA を見出した。このヒト由来 cDNA の塩基配列を、推定アミノ酸配列と共に配列番号 2 に示す。配列番号 1 には、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列のみを取り出して示す。配列番号 1 記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドは、マウス T2BP と高い相同性 (約 78%) を有し、また、フォークヘッド関連 (forkhead-associated (FHA)) ドメインのような特徴的なモチーフを有することから、ヒト T2BP であることは明らかである。このように、本発明のポリペプチド (T2BP) の好ましい実施例は、

配列番号 1 又は 3 で示されるアミノ酸配列を有する。

下記実施例において、具体的に示されるように、T2BPの第 1 番目から第 1 6 2 番目までの領域（以下、例えば第 1 番目のアミノ酸残基を便宜的に「1aa」のように、また、例えば第 1 番目から第 1 6 2 番目のアミノ酸残基から成る領域を「1-1 6 2 aa」のように記載することがある）のみから成る欠失変異体が、TRAF2 との結合能を示したことから、この領域を含んでいればTRAF2との結合能を有する。また、一般に生理活性を有するポリペプチドのうち、少数のアミノ酸配列が置換し、欠失し又は挿入された場合でも、該生理活性が維持されることがあることは周知である。実際、ヒトとマウスのT2BPでは、1-1 6 2 aaの領域で 3 3 個のアミノ酸残基が相違している（相同性約 8 0 %）。従って、本発明のポリペプチドは、配列表の配列番号 1 又は 3 に示されるアミノ酸配列の第 1 番目～第 1 6 2 番目のアミノ酸配列を有する領域又は該アミノ酸配列において、1～4 0 個のアミノ酸残基が置換し、欠失し若しくは挿入されたアミノ酸配列を有する領域を含み、TRAF2との結合能を有するポリペプチドと定義される。置換、欠失、挿入されるアミノ酸数は、上記した 3 3 個以下であることが好ましい。

配列番号 1 のアミノ酸配列の1-1 6 2 aaにおいて、配列番号 3 のアミノ酸配列の1-1 6 2 aaと相違しているアミノ酸残基は、2、3、2 0、2 6、2 8、3 2、3 5、3 7、3 8、4 1、4 4、5 5、5 7、6 8、7 1、7 4、7 7、9 5、9 7、1 0 0、1 0 1、1 1 4、1 1 7、1 2 6、1 2 7、1 3 4、1 3 6、1 4 3、1 4 5、1 4 7、1 5 6、1 5 7 及び 1 5 8 aaである。従って、これらのアミノ酸残基は重要ではなく、置換又は欠失していてもよく、また、これらのアミノ酸残基に隣接する位置に 1～3 個のアミノ酸残基が挿入されていてもよい。また、1aaのメチオニンは、転写開始コドンであるのでほとんど全てのタンパク質は、翻訳直後の1aaはメチオニンであるが、多くの生理活性タンパク質では、1aaはメチオニン以外のアミノ酸であることから、1aaのメチオニンがなくてもTRAF2との結合能は維持されと考えられる。

同様に、配列番号 3 のアミノ酸配列の1-1 6 2 aaにおいて、配列番号 1 の1-1 6 2 aaのアミノ酸配列と相違しているアミノ酸残基は、2、3、2 0、2 7、3

1、34、36、37、38、41、44、55、57、68、71、74、77、95、97、100、101、114、117、126、127、134、136、143、145、147、156、157及び158aaである。従って、これらのアミノ酸残基は重要ではなく、置換又は欠失していてもよく、また、これらのアミノ酸残基に隣接する位置に1～3個のアミノ酸残基が挿入されていてもよい。さらに、配列番号1では、配列番号3の25aaと26aaの間にアミノ酸残基が挿入されていることから、配列番号3の25aaと26aaの間に1～3個のアミノ酸残基が挿入されていてもよい。また、1aaのメチオニンは、転写開始コドンであるのでほとんど全てのタンパク質は、翻訳直後の1aaはメチオニンであるが、多くの生理活性タンパク質では、1aaはメチオニン以外のアミノ酸であることから、1aaのメチオニンがなくてもTRAF2との結合能は維持されると考えられる。

上記の通り、1-162aa断片がTRAF2との結合能を有することは実験的に確認されているが、1-184aa（全長）を有する方がTRAF2との結合能がより高いことからより好ましい。配列番号1のアミノ酸配列において、配列番号3のアミノ酸配列と相違しているアミノ酸残基は、2、3、20、26、28、32、35、37、38、41、44、55、57、68、71、74、77、95、97、100、101、114、117、126、127、134、136、143、145、147、156、157、158、163、165、168、169、170、171、172、173、177及び184aaである。従って、これらのアミノ酸残基は重要ではなく、置換又は欠失していてもよく、また、これらのアミノ酸残基に隣接する位置に1～3個のアミノ酸残基が挿入されていてもよい。また、上記の通り、1aaのメチオニンは、転写開始コドンであるのでほとんど全てのタンパク質は、翻訳直後の1aaはメチオニンであるが、多くの生理活性タンパク質では、1aaはメチオニン以外のアミノ酸であることから、1aaのメチオニンがなくてもTRAF2との結合能は維持されると考えられる。同様に、配列番号3のアミノ酸配列において、配列番号1のアミノ酸配列と相違しているアミノ酸残基は、2、3、20、27、31、34、36、37、38、41、44、55、57、68、71、74、77、95、97、100、101、114、117、

1 2 6、1 2 7、1 3 4、1 3 6、1 4 3、1 4 5、1 4 7、1 5 6、1 5 7、
1 5 8、1 6 3、1 6 5、1 6 8、1 6 9、1 7 0、1 7 1、1 7 2、1 7 3、
1 7 7 及び 1 8 4 aa である。従って、これらのアミノ酸残基は重要ではなく、置
換又は欠失していてもよく、また、これらのアミノ酸残基に隣接する位置に 1 ~
5 3 個のアミノ酸残基が挿入されていてもよい。さらに、上記の通り、配列番号 1
では、配列番号 3 の 25aa と 26aa の間にアミノ酸残基が挿入されていることから、
配列番号 3 の 25aa と 26aa の間に 1 ~ 3 個のアミノ酸残基が挿入されていてもよい。
また、上記の通り、1aa のメチオニンは、転写開始コドンであるのでほとんど全
てのタンパク質は、翻訳直後の 1aa はメチオニンであるが、多くの生理活性タン
10 パク質では、1aa はメチオニン以外のアミノ酸であることから、1aa のメチオニン
がなくても TRAF2 との結合能は維持されると考えられる。

本発明のポリペプチドを相同性に基づいて規定すると、配列表の配列番号 1 又
は 3 に示されるアミノ酸配列の第 1 番目 ~ 第 1 6 2 番目のアミノ酸配列を有する
領域又は該アミノ酸配列と 7 0 % 以上の相同性を有する領域を含み、TRAF2 との
15 結合能を有するポリペプチドである。配列番号 1 と 3 の 1-1 6 2 aa の相同性は、
約 8 0 % であるので、1-1 6 2 aa の相同性は 8 0 % 以上であることが好ましい。
また、上記の通り、配列番号 1 又は 3 に示されるアミノ酸配列の全長を有するこ
とがより好ましいが、この場合の両者の相同性は約 7 8 % であるので、全長の相
同性は 7 8 % 以上であることが好ましい。なお、ここで言う、相同性は、図 1 の
20 B に示されるように、両者のポリペプチドのアミノ酸残基ができるだけ多く一致
するように整列させ、一致しているアミノ酸残基の数を全体のアミノ酸残基の数
で除することにより計算できる。なお、このような相同性の計算は、BLAST のよ
うな市販のソフトを用いて容易に行うことができる。長さが異なる配列同士を比
較する場合には、短い方のアミノ酸残基数で除する。

25 本発明のポリペプチドは、下記実施例に詳述する方法によっても生産できるし、
本発明によりそれをコードする cDNA の塩基配列が明らかになったので、RT-P
CR 等の常法によりポリペプチドをコードする核酸を調製し、それを常法により細
胞中で発現させることにより容易に生産することができる。

本発明は、また、上記本発明のポリペプチドをコードする核酸を提供する。ここで言う「核酸」には、DNAもRNAも包含される。これらの核酸は、上記本発明のポリペプチドを遺伝子工学的に産生する際の鋳型として利用することができる。核酸の好ましい実施例の具体的な塩基配列は、上記の通り配列番号2及び4に示されている。また、上記の通り、置換、欠失、挿入を含むポリペプチドであって、TRAF2との結合能を有するものをコードする核酸も本発明の核酸である。このような核酸は、配列番号2又は4で示される塩基配列を有する核酸又は該核酸とストリンジェント条件下(すなわち、5 x Denhardt's reagent, 6 x SSC, 0.5 % SDS又は0.1% SDSといった一般的なハイブリダイゼーション溶液を用いて50 ~ 65℃で、好ましくは50℃と60℃の2段階、又は、50℃、55℃、60℃、65℃の4段階で反応を行なう)でハイブリダイズするものであることが好ましい。

本発明は、上記本発明の核酸を含み、宿主細胞中で該核酸を発現することができる発現ベクターをも提供する。このような発現ベクターは、上記本発明の核酸を市販の発現ベクターのクローニング部位に挿入することにより容易に調製することができ、下記実施例にも具体的に記載されている。また、本発明は、このような本発明の発現ベクターにより上記本発明の核酸が導入された細胞であって、上記本発明のポリペプチドを発現する細胞をも提供する。このような細胞は、上記本発明の発現ベクターを常法により宿主細胞にトランスフェクトすることにより容易に調製でき、下記実施例にも具体的に記載されている。

本発明は、また、上記本発明の核酸とハイブリダイズする核酸であって、上記本発明の核酸の検出に用いることができる核酸(以下、便宜的に「検出用核酸」と言うことがある)をも提供する。このような核酸は、PCRやNASBA等の核酸増幅法のプライマーであってもよいし、標識を付したプローブであってもよい。プライマーの場合、ハイブリダイズしないと鋳型核酸の増幅が起きないので、増幅が起きるか否かにより該プライマーとハイブリダイズする本発明の核酸が被検試料中に含まれているか否かを調べることができる。また、プローブの場合、ハイブリダイズしないとプローブの標識が検出されないので、プローブの標識を検

出することにより被検試料中に本発明の核酸が存在するか否かを検出することができる。これらの検出用核酸は、検出の特異性を高めるために、塩基数が15以上であることが好ましく、プライマーの場合には塩基数が20～50がより好ましく、プローブの場合には塩基数が20～全長が好ましい。なお、このような検
5 出用核酸は、リアルタイム検出PCRのプライマーに用いることや、プローブの標識を定量すること等により、本発明の核酸の定量に利用することもできる。

PCRのような核酸増幅法自体は、この分野において周知であり、そのための試薬キット及び装置も市販されているので容易に行うことができる。すなわち、例えば、鋳型となる被検核酸（例えば、本発明のポリペプチドの遺伝子のcDNA
10 A）と本発明の検出用核酸（プライマー）の一对とを、緩衝液中で、Taqポリメラーゼ及びdNTPの存在下で、変性、アニーリング、伸長の各工程を反応液の温度を変化させることにより行う。通常、変性工程は、90～95℃、アニーリング工程は、鋳型とプライマーのT_m又はその近傍（好ましくは±4℃以内）、伸長工程はTaqポリメラーゼの至適温度である72℃で行われる。各工程は30秒
15 ～2分程度で適宜選択される。この熱サイクルを例えば25～40回程度繰り返すことにより、一对のプライマーで挟まれた鋳型核酸の領域が増幅される。なお、核酸増幅法はPCRに限定されるものではなく、この分野において周知の他の核酸増幅法も用いることができる。このように、上記した本発明の測定用核酸の一对をプライマーとして用い、被検核酸を鋳型として用いて核酸増幅法を行うと、
20 被検核酸が増幅されるのに対し、検体中に被検核酸が含まれない場合には増幅が起きないので、増幅産物を検出することにより検体中に被検核酸が存在するか否かを知ることができる。増幅産物の検出は、増幅後の反応溶液を電気泳動し、バンドをエチジウムブロミド等で染色する方法や、電気泳動後の増幅産物をナイロン膜等の固相に不動化し、被検核酸と特異的にハイブリダイズする標識プローブ
25 とハイブリダイズさせ、洗浄後、該標識を検出することにより行うことができる。また、クエンチャー蛍光色素とレポーター蛍光色素を用いたいわゆるリアルタイム検出PCRを行うことにより、検体中の被検核酸の量を定量することも可能である。なお、リアルタイム検出PCR用のキットも市販されているので、容易に

行うことができる。さらに、電気泳動バンドの強度に基づいて被検核酸を半定量することも可能である。なお、被検核酸は、mRNAでも、mRNAから逆転写したcDNAであってもよい。被検核酸としてmRNAを増幅する場合には、上記一対のプライマーを用いたNASBA法(3SR法、TMA法)を採用することもできる。

5 NASBA法自体は周知であり、そのためのキットも市販されているので、上記一対のプライマーを用いて容易に実施することができる。

プローブとしては、上記検出用核酸に蛍光標識、放射標識、ビオチン標識等の標識を付した標識プローブを用いることができる。核酸の標識方法自体は周知である。被検核酸又はその増幅物を固相化し、標識プローブとハイブリダイズさせ、

10 洗浄後、固相に結合された標識を測定することにより、検体中に被検核酸が存在するか否かを調べることができる。あるいは、検出用核酸を固相化し、被検核酸をハイブリダイズさせ、固相に結合した被検核酸を標識プローブ等で検出することも可能である。このような場合、固相に結合した測定用核酸もプローブと呼ばれる。なお、核酸プローブを用いた被検核酸の測定方法もこの分野において周知

15 であり、緩衝液中、核酸プローブを被検核酸とTm又はその近傍(好ましくは±4℃以内)で接触させることによりハイブリダイズさせ、洗浄後、ハイブリダイズした標識プローブ又は固相プローブに結合された鋳型核酸を測定することにより行うことができる。このような方法には、下記実施例に記載されるノーザンブロットやインサイチュハイブリダイゼーション、さらにはサザンブロット法等

20 の周知の方法が包含される。

下記実施例で具体的に示されるように、本発明のポリペプチドは、NF-κBシグナルを活性化させ、それがTNFを介した伝達であることが示唆されることから、その機能を阻害することにより、NF-κBシグナルを減弱させることが可能である。よって、NF-κBシグナルが関与する疾患として炎症、リウマチなどの治療

25 薬開発のためのターゲットとして有用である。また、NF-κBシグナルは破骨細胞の活性化にも関与しているので、骨そしょう症治療薬開発のためのターゲットとしても有用である。さらに、本発明の検出用核酸は、T2BP遺伝子の発現量の測定に用いることができるので、炎症、リウマチ、骨そしょう症などの病態のモ

ニターに使用することが可能である。また、炎症、リウマチ、骨そしょう症などの治療薬が、T2BP 遺伝子の発現を抑制するものである場合やアンチセンスRNAであるような場合には、これらの治療薬の薬効の評価に用いることもできる。

実施例

- 5 以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もつとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。実験はすべてマウスT2BPを用いておこなった。

材料及び方法

細胞培養

- 10 10%熱不活化ウシ胎児血清(FBS)、200 U/ml ペニシリン及び200 μ g/ml ストレプトマイシンを添加した最少必須培地中で、ヒト胎児腎臓セルライン293 (Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., Nairn, R.: J Gen Virol, 36, 59-74 (1977)。理化学研究所細胞バンクから入手) を培養した。293T 細胞 (DuBridge RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP: Mol Cell Biol 7, 379-87 (1987)) 及びCHO-K1 細胞 (Kao, F. T., Puck, T. T.: Proc Nat Acad Sci U S A, 60, 1275-1281 (1968)。理化学研究所細胞バンクから入手) は、それぞれ10% FBS 及び抗生物質を添加した、ダルベッコ修飾イーグル培地及びF-12 栄養混合培地 (Ham's F-12) 中でそれぞれ維持した。

哺乳動物2-ハイブリッドアッセイ

- 20 公知の方法(15)に従い行った。すなわち、先ず、次のようにして2段階PCRによりアッセイ用サンプルを調製した。T2BP 及びTRAF2 のcDNA (それぞれマウス生後3日目の胸腺由来のcDNAライブラリー、成マウスの精巣由来のcDNAライブラリー中に含まれる) を鋳型として各々のタンパク質コード領域を含む領域を、タグを付けた遺伝子特異的プライマー (正鎖プライマーT2BP, gaag gagccgccaccatgtccacctttgaagacg; 正鎖プライマーTRAF2, gaaggagccgccaccatgctgcagccagtgt、公知のタンパク領域予測ソフトを用いて設計) 及びベクター配列に対するプライマー (逆鎖プライマーP8; agcggataacaatttcacacaggaaa) を用いたPCRにより増幅した (第1段)。また、SV40 poly-A シグナルのDN

A断片及びGal4 DNA-結合ドメイン又はヘルペスウイルスV16転写活性化ドメインが後に続くヒトサイトメガロウイルス(CMV)極初期プロモーターを増幅した(用いた正逆のプライマーの塩基配列および鋳型は、それぞれ次のとおり;SV40 poly-A シグナルのDNA断片, gtttcctgtgtgaaattgttatccgctgcagacatgataagata cattg(正)、agcaagttcagcctgggttaagatccttatcgattttaccac(逆)、pG5luc(Promega社製);Gal4断片、ccaatatgaccgccatgttggc(正)、catggtggcggctccttcggcgatacagtcaactg(逆)、pBIND(Promega社製);VP16断片、ccaatatgaccgccatgttggc(正)、catggtggcggctccttcaagtcgacggatccctggc(逆)、pACT(Promega社製))。第2段のPCRでは、第1のPCR産物と、SV40 poly-A シグナル断片と、Gal4又はVP16断片とを連結し、PCR産物がGal4又はVP16ドメインとの融合タンパク質として発現されるように設計した。なお、第2段のPCRで用いたプライマーの塩基配列は、gccatgttggcattgattattgac(正)及びagcaagttcagcctgggttaag(逆)であった。得られたPCR産物(0.13 μ l)を、20 ngのレポータープラスミドpG5lucとともに 2.2×10^4 個のCHO-K1細胞にトランスフェクション試薬LF2000(Invitrogen社製)を用いてトランスフェクトした。20時間インキュベートした後、Steady-Glo(商品名)ルシフェラーゼアッセイシステム(Promega社製)によりルシフェラーゼレポーター活性を測定した。

免疫共沈降分析

T2BP及びTRAF2 cDNAのタンパク質コード領域を含む領域を、遺伝子特異的プライマー(T2BPの正鎖用プライマーの塩基配列; gacgcgtcgaccatgtccaccttgaagacg、TRAF2の正鎖用プライマーの塩基配列; gacgcgtcgaccatggctgcagccagtgt。逆鎖用プライマーはベクター部位に対して作成し、塩基配列はccggttaagcggccgcagcggataacaatttcacacaggaaac)を用いたPCRにより増幅した後に制限酵素SalIおよびNotIで消化した断片を、発現ベクターpCMV-HA及びpCMV-Myc(いずれもClontech社製)にそれぞれサブクローニングした。トランスフェクション試薬LF2000(商品名)を用い、HA-T2BP又はMyc-T2BPを発現するための発現用ベクター2.5 μ gで293T細胞(1×10^6 個)をトランスフェクトした。なお、HA又はMycは抗体が認識するタグ配列の名前を意味する。24時間インキュベ

ートした後、細胞を回収し、10 mM of Tris-HCl (pH 7.8), 1% NP40 (商品名), 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF and 10 μ g/ml ロイペプチン (PEPTIDE INSTITUTE Inc. 製) から成る TNE 緩衝液で溶解した。10,000 x g で 15 分間遠心後、上清を単離し、5 μ g の抗 HA タグ抗体 (Santa Cruz 社製) で免疫沈降させた。共沈殿した Myc-TRAF2 の検出は、ウェスタンブロット分析により行った。Laemmli サンプル緩衝液中の試料を 5 分間煮沸し、12.5% SDS-PAGE にかき、タンパク質を Hybond-ECL 膜 (Amersham 社製) に転写した。ウェスタンブロットは、抗 Myc タグ抗体と 1 時間、次いで HRP-結合抗マウス IgG (Amersham 社製) と 1 時間インキュベートし、次いで洗浄を行う、通常の方法により行った。シグナルの検出は、ECL システム (Amersham 社製) 及び X-線フィルム (Kodak 社製) を用いて行った。また、培養上清を、上記した一次抗体及び二次抗体を用いた直接的なウェスタンブロットに付すことにより、HA-T2BP 及び Myc-TRAF2 の発現を確認した。

ノーザン分析

T2BP 及び TRAF2 cDNA を、ノーザンブロット分析のプローブとして用いた。Random Primer Labeling Kit Ver. 2 (宝酒造社製) を用いて、プローブを [32 P] で標識した。マウス MTN ブロット膜およびマウスセルライン MTN ブロット膜 (いずれも Clontech 社製) を購入した。ExpressHyb (商品名) ハイブリダイゼーション溶液 (Clontech 社製) を用い、68°C で 30 分間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションシグナルは、X-線フィルムにより検出した。

シグナル伝達経路分析

T2BP の発現ベクターを、100 ng のレポーターベクター pNF- κ B-Luc 又は pAP1-Luc (Clontech 社製) とともに、トランスフェクション試薬 LF2000 を用いて、96 穴アッセイプレート中の 5×10^4 個の 293 細胞にトランスフェクトした。24 時間インキュベート後、細胞を 5 ng/ml の TNF で 6 時間処理し (+) 又は処理しなかった (-)。レポーター遺伝子のルシフェラーゼ活性は上記の通りに測定した。

結果

FHA ドメインを有する新規な TRAF2 結合タンパク質 T2BP の同定

本願発明者らは、哺乳動物 2 ハイブリッド法に基づく、PCR-媒介サンプル調製及び高効率アッセイシステムを開発したことを報告している(15)。このシステムを用い、マウス全長 cDNA が豊富に含まれるライブラリーから得た約 6000 個の cDNA をマトリックス的に分析した。T2BP (TRAF2 結合タンパク質) と命名された新規な TRAF2 相互作用タンパク質が、VP16 転写活性化ドメインに融合された TRAF2 をプレイ (prey) として用いた時に同定された (図 1 の A)。マウス T2BP の cDNA 配列 (配列番号 4) は、5 個の A+T リッチモチーフ ATTTA を 3' 非翻訳領域中に含む。これは、サイトカインや癌原遺伝子のような多くの短命 mRNA 中に見出されるものであり、従って、潜在的な不安定化要素である(16, 17)。図 1 の B に示されるように、T2BP は、184 個のアミノ酸残基から成り、等電点 (pI) が 4.79 で分子量が 21560 と計算される。Pfam モチーフデータベース検索 (<http://pfam.wustl.edu/index.html>) によりモチーフ解析を行ったところ、リン酸化ペプチド結合モチーフ (18, 19) として知られるフォークヘッド関連 (fork head-associated (FHA)) ドメインが T2BP の中央領域に位置することがわかった。さらに、BLAST により相同性検索を行ったところ、マウス T2BP のヒトオースログが同定された (図 1 の B、配列番号 1、2)。マウス及びヒト T2BP は、アミノ酸配列全体に亘り高度に保存されていた。

なお、図 1 の A は、哺乳動物 2-ハイブリッドアッセイの結果を示す。プレイ-TRAF2 及び/又はバイト (bait)-T2BP を、レポーターベクター pG5luc と共に CHO-K1 細胞にトランスフェクトしてレポーター遺伝子であるルシフェラーゼの活性を測定した。プレイ-TRAF2 又はバイト-T2BP トランスフェクションについての平均値を基礎にして相対値を計算した。

図 1 の B は、マウス及びヒト T2BP (それぞれ mT2BP 及び hT2BP と記載) のアミノ酸配列を示す。両者において同一のアミノ酸残基は、背景に影をつけて示した。FHA 領域は枠で囲んで示す。マウス及びヒト T2BP のアミノ酸配列は、cDNA から推定したものである。

T2BP は、TRAF2 の TRAF ドメインと相互作用する

TRAF2 は、図 2 の A に示すように、数種類の周知のモチーフ (1-4) を有するア

ダブタータンパク質である。どのモチーフが T2BP との相互作用に関わるのかを調べるため、本願発明者らは、哺乳動物 2-ハイブリッド法を用いて野生型 TRAF2 及びその欠失変異体との相互作用を調べた。その結果、最小の相互作用領域は、TRAF ドメインとして知られる、カルボキシ末端側の半分を包含することがわかった。TRAF ドメインは、TRAF-N 及び TRAF-C サブドメインに分けられる (20)。T2BP は、TRAF2[1-357] 及び TRAF2[348-501] のいずれとも相互作用しなかったもので、T2BP との相互作用には両方のサブドメインが必要と考えられる。また、インビトロで GST-プルダウンアッセイを用いて同じ結果が得られている。次いで、TRAF2 との相互作用に關与する T2BP 中の領域を調べた (図 2 の B)。調べた欠失変異体のうち、T2BP[1-162] 以外の変異体は、TRAF2 との結合能を喪失していた。

なお、図 2 の A は、TRAF2 及びその欠失変異体を模式的に示すもの並びにそれらと野生型 T2BP との相互作用を示す。図 2 の B は、T2BP 及びその欠失変異体を模式的に示すもの並びにそれらと野生型 TRAF2 との相互作用を示す。

T2BP と TRAF2 との相互作用の免疫共沈降解析

T2BP と TRAF2 との相互作用は、免疫共沈降法により *in vivo* で確認された (図 3)。本願発明者らは、HA-タグを付けた T2BP 及び Myc-タグを付けた TRAF2 を産生する発現ベクターを構築した。これらの発現ベクターを 293T 細胞にトランスフェクトし、細胞抽出物を、抗 HA タグ抗体を用いて免疫沈降に付した。抗 Myc タグ抗体を用いたウェスタンブロット (図 3 の上段) により、Myc-TRAF2 が HA-T2BP と特異的に免疫共沈降されたことが示された。

なお、図 3 の中段は、細胞抽出物をウェスタンブロットに付し、HA-T2BP の発現を確認したもの、下段は同様に Myc-TRAF2 の発現を確認したものである。また、図 3 において、IP 及び IB はそれぞれ免疫沈降及び免疫ブロットを示す。

T2BP の発現プロフィール

TRAF2 と T2BP がこれらの間で相互作用を行うためには、これらが同じ組織で共に発現していることが必要であるので、ノーザンブロット分析により T2BP 及び TRAF2 の発現プロフィールを調べた。T2BP cDNA をプローブとして用いた場合、

2.3 kb のシグナルが検出された。これは得られた cDNA のサイズである 2.0 kb に対応する、合理的なサイズであった。T2BP は、成体の主な組織において普遍的に発現されていた (図 4)。主なシグナルに加え、T2BP について 3.0 kb と 4.0 kb に弱い 2 つのシグナルが観察された。TRAF2 cDNA をプローブとして用いた結果からわかるように、TRAF2 遺伝子は、成体の主な全ての組織中で同様に発現されており、これは先の報告 (21) と一致している。次に、どのようなマウス培養細胞株において T2BP が良く発現しているかを調べた。調べた培養細胞株は、PU 5-1.8 (PU5-R), RAW264.7, K-BALB (K-234), M-MSV-BALB/3T3, L-M, P19, Hepa1-6, R1.1, L1210, P388D1, P815 及び NB41A3 であった。これらのうち、T2BP は、RAW264.7, L1210, P388D1 といった免疫系細胞由来の培養細胞で高発現していることが明らかとなった。

T2BP をトランスフェクトした 293 細胞中での NF- κ B 及び AP-1 の活性化

NF- κ B 及び AP-1 の TNF-誘導活性化は、293 細胞を包含する数種類のセルラインにおいて良く確立されており、そこでは、TRAF2 がシグナル伝達において鍵となる役割を果たす (11, 22)。これらの経路に対する T2BP の効果を調べるために、ルシフェラーゼ活性により NF- κ B の活性化を検出することを可能にするレポーターベクターと共に、293 細胞中で T2BP を過剰発現させた (図 5 の左)。レポーターベクターのみをトランスフェクトした 293 細胞を TNF 処理すると、NF- κ B の活性化が明瞭に観察された。T2BP の過剰発現により、TNF 処理なしで NF- κ B が濃度依存的に活性化された。T2BP-トランスフェクト 293 細胞を TNF 処理した場合には、TNF 処理していない T2BP-トランスフェクト 293 細胞と同等か僅かに低い NF- κ B の活性化が見られた。AP-1 の活性化に対する T2BP の効果を評価するために同様な実験を行った (図 5 の右)。TNF 処理したコントロール 293 細胞中で、AP-1 の活性化が観察された。TNF で処理していない 293 細胞中で T2BP を過剰発現させると、AP-1 が濃度依存的に活性化された。T2BP-トランスフェクト細胞を TNF 処理した場合、TNF 処理していない T2BP-トランスフェクト細胞よりも AP-1 の活性化が少なかった。このように、これらの結果は、T2BP の過剰発現により、NF- κ B 及び AP-1 の両方が、TNF 処理なしで活性化され

ることを示している。

文献

1. Bradley, J. R., and Pober, J. S. (2001) *Oncogene* 20, 6482-6491.
2. Wajant, H., Henkler, F., and Scheurich, P. (2001) *Cell Signal* 13,
5 389-400.
3. Inoue, J., Ishida, T., Tsukamoto, N., Kobayashi, N., Naito, A.,
Azuma, S., and Yamamoto, T. (2000) *Exp Cell Res* 254, 14-24.
4. Wajant, H., Grell, M., and Scheurich, P. (1999) *Cytokine Growth
Factor Rev* 10, 15-26.
- 10 5. Baker, S. J., and Reddy, E. P. (1998) *Oncogene* 17, 3261-3270.
6. Hsu, H., Xiong, J., and Goeddel, D. V. (1995) *Cell* 81, 495-504.
7. Shu, H. B., Takeuchi, M., and Goeddel, D. V. (1996) *Proc Natl Ac
ad Sci U S A* 93, 13973-13978.
8. Stanger, B. Z., Leder, P., Lee, T. H., Kim, E., and Seed, B. (19
15 95) *Cell* 81, 513-523.
9. McCarthy, J. V., Ni, J., and Dixit, V. M. (1998) *J Biol Chem* 273,
16968-16975.
10. Nishitoh, H., Saitoh, M., Mochida, Y., Takeda, K., Nakano, H., R
othe, M., Miyazono, K., and Ichijo, H. (1998) *Mol Cell* 2, 389-395.
- 20 11. Baud, V., and Karin, M. (2001) *Trends Cell Biol* 11, 372-377.
12. Baud, V., Liu, Z. G., Bennett, B., Suzuki, N., Xia, Y., and Karin,
M. (1999) *Genes Dev* 13, 1297-1308.
13. Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V. M. (1
995) *Cell* 81, 505-512.
- 25 14. Hu, W. H., Johnson, H., and Shu, H. B. (2000) *J Biol Chem* 275, 1
0838-10844.
15. Suzuki, H., Fukunishi, Y., Kagawa, I., Saito, R., Oda, H., Endo,
T., Kondo, S., Bono, H., Okazaki, Y., and Hayashizaki, Y. (2001) *Genome*

Res 11, 1758-1765.

16. Wilson, G. M., and Brewer, G. (1999) *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 62, 257-291.
17. Guhaniyogi, J., and Brewer, G. (2001) *Gene* 265, 11-23.
- 5 18. Li, J., Lee, G. I., Van Doren, S. R., and Walker, J. C. (2000) *J Cell Sci* 113 Pt 23, 4143-4149.
19. Durocher, D., Henckel, J., Fersht, A. R., and Jackson, S. P. (1999) *Mol Cell* 4, 387-394.
20. Cheng, G., Cleary, A. M., Ye, Z. S., Hong, D. I., Lederman, S.,
10 and Baltimore, D. (1995) *Science* 267, 1494-1498.
21. Rothe, M., Wong, S. C., Henzel, W. J., and Goeddel, D. V. (1994) *Cell* 78, 681-692.
22. Rothe, M., Sarma, V., Dixit, V. M., and Goeddel, D. V. (1995) *Science* 269, 1424-1427.
- 15 23. Hofmann, K., and Bucher, P. (1995) *Trends Biochem Sci* 20, 347-349.
24. Arch, R. H., Gedrich, R. W., and Thompson, C. B. (2000) *Biochem Biophys Res Commun* 272, 936-945.
25. Takeuchi, M., Rothe, M., and Goeddel, D. V. (1996) *J Biol Chem* 271, 19935-19942.
20
26. Qian, Y., Commane, M., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K., and Li, X. (2001) *J Biol Chem* 276, 41661-41667.
27. Rothe, J., Gehr, G., Loetscher, H., and Lesslauer, W. (1992) *Immunol Res* 11, 81-90.
- 25 28. Wajant, H., and Scheurich, P. (2001) *Int J Biochem Cell Biol* 33, 19-32.
29. Gravallesse, E. M., Galson, D. L., Goldring, S. R., and Auron, P. E. (2001) *Arthritis Res* 3, 6-12.

30. Kobayashi, N., Kadono, Y., Naito, A., Matsumoto, K., Yamamoto, T., Tanaka, S., and Inoue, J. (2001) *Embo J* 20, 1271-1280.
31. Zhang, Y. H., Heulsmann, A., Tondravi, M. M., Mukherjee, A., and Abu-Amer, Y. (2001) *J Biol Chem* 276, 563-568.

請求の範囲

1. 配列表の配列番号 1 に示されるアミノ酸配列の第 1 番目～第 162 番目のアミノ酸配列を有する領域又は該アミノ酸配列において、1～40 個のアミノ酸残基が置換し、欠失し若しくは挿入されたアミノ酸配列を有する領域を含み、TRAF2 との結合能を有するポリペプチド。
2. 配列表の配列番号 1 に示されるアミノ酸配列の第 1 番目～第 162 番目のアミノ酸配列を有する領域又は該アミノ酸配列において、1～33 個のアミノ酸残基が置換し、欠失し若しくは挿入されたアミノ酸配列を有する領域を含む請求項 1 記載のポリペプチド。
3. 配列表の配列番号 1 に示されるアミノ酸配列の第 1 番目～第 162 番目のアミノ酸配列中、第 1、2、3、20、26、28、32、35、37、38、41、44、55、57、68、71、74、77、95、97、100、101、114、117、126、127、134、136、143、145、147、156、157 及び 158 番目のアミノ酸のうち少なくとも 1 個が置換し若しくは欠失し、又はこれらのアミノ酸の少なくとも 1 個に隣接する位置に各 1～3 個のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列を有する領域を含む請求項 2 記載のポリペプチド。
4. 配列表の配列番号 1 に示されるアミノ酸配列の第 1 番目～第 162 番目のアミノ酸配列を有する領域を含む請求項 2 記載のポリペプチド。
5. 配列表の配列番号 1 に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列中、第 1、2、3、20、26、28、32、35、37、38、41、44、55、57、68、71、74、77、95、97、100、101、114、117、126、127、134、136、143、145、147、156、157、158、163、165、168、169、170、171、172、173、177 及び 184 番目のアミノ酸のうち少なくとも 1 個が置換し、欠失し、又はこれらのアミノ酸の少なくとも 1 個に隣接する位置に 1～3 個のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列を有し、TRAF2 との結合能を有する請求項 2 記載のポリペプチド。
6. 配列表の配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有する請求項 5 記載のポリ

ペプチド。

7. 配列表の配列番号3に示されるアミノ酸配列の第1番目～第162番目のアミノ酸配列を有する領域又は該アミノ酸配列において、1～40個のアミノ酸残基が置換し、欠失し若しくは挿入されたアミノ酸配列を有する領域を含み、TR AF2 との結合能を有するポリペプチド。

8. 配列表の配列番号3に示されるアミノ酸配列の第1番目～第162番目のアミノ酸配列を有するペプチド又は該アミノ酸配列において、1～33個のアミノ酸残基が置換し、欠失し若しくは挿入されたアミノ酸配列を有する領域を含む請求項7記載のポリペプチド。

9. 配列表の配列番号3に示されるアミノ酸配列の第1番目～第162番目のアミノ酸配列中、第1、2、3、20、27、31、34、36、37、38、41、44、55、57、68、71、74、77、95、97、100、101、114、117、126、127、134、136、143、145、147、156、157及び158番目のアミノ酸のうち少なくとも1個が置換し、欠失し、又はこれらのアミノ酸の少なくとも1個に隣接する位置並びに第25番目と第26番目の間の位置の少なくともいずれかに各1～3個のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列を有する領域を含む請求項8記載のポリペプチド。

10. 配列表の配列番号3に示されるアミノ酸配列の第1番目～第162番目のアミノ酸配列を有する領域を含む請求項8記載のポリペプチド。

11. 配列表の配列番号3に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列中、第1、2、3、20、27、31、34、36、37、38、41、44、55、57、68、71、74、77、95、97、100、101、114、117、126、127、134、136、143、145、147、156、157、158、163、165、168、169、170、171、172、173、177及び184番目のアミノ酸のうち少なくとも1個が置換し、欠失し、又はこれらのアミノ酸の少なくとも1個に隣接する位置並びに第25番目と第26番目の間の位置の少なくともいずれかに1～3個のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列を有する請求項8記載のポリペプチド。

12. 配列表の配列番号3に示されるアミノ酸配列を有する請求項11記載のポリペプチド。

13. 配列表の配列番号1又は3に示されるアミノ酸配列の第1番目～第162番目のアミノ酸配列を有する領域又は該アミノ酸配列と70%以上の相同性を有する領域を含み、TRAF2との結合能を有するポリペプチド。

14. 前記相同性が80%以上である請求項13記載のポリペプチド。

15. 配列表の配列番号1又は3に示されるアミノ酸配列と70%以上の相同性を有し、TRAF2との結合能を有するポリペプチド。

16. 前記相同性が78%以上である請求項15記載のポリペプチド。

17. 請求項1ないし16のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードする核酸。

18. 配列表の配列番号2又は4で示される塩基配列を有する核酸又は該核酸の相補配列とストリンジェント条件下でハイブリダイズする請求項17記載の核酸。

19. 請求項17又は18記載の核酸を含み、宿主細胞中で該核酸を発現することができる発現ベクター。

20. 請求項17又は18記載の核酸が導入された細胞であって、請求項1ないし16のいずれか1項に記載のポリペプチドを発現する細胞。

21. 請求項17又は18記載の核酸とハイブリダイズする核酸であって、請求項17又は18記載の核酸の検出に用いることができる核酸。

22. 配列表の配列番号2又は4記載の塩基配列を有する核酸とハイブリダイズする請求項21記載の核酸。

23. プライマー又はプローブである請求項21又は22記載の核酸。

24. 塩基数が15以上である請求項21ないし23のいずれか1項に記載の核酸。

25. 請求項23記載のプローブと、請求項18記載の核酸とを接触させることによりハイブリダイズさせ、ハイブリダイズした核酸を測定することを含む、請求項18記載の核酸の測定方法。

26. 請求項23記載のプライマーの一对をプライマーとして用い、請求項18記載の核酸を鋳型として核酸増幅法を行い、増幅産物を測定することを含む、請求項18記載の核酸の測定方法。

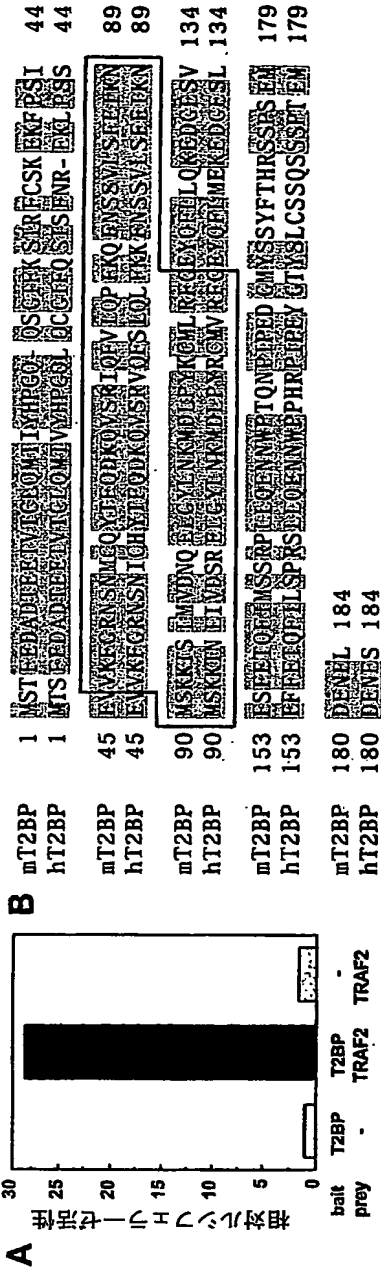


図 1

2/4

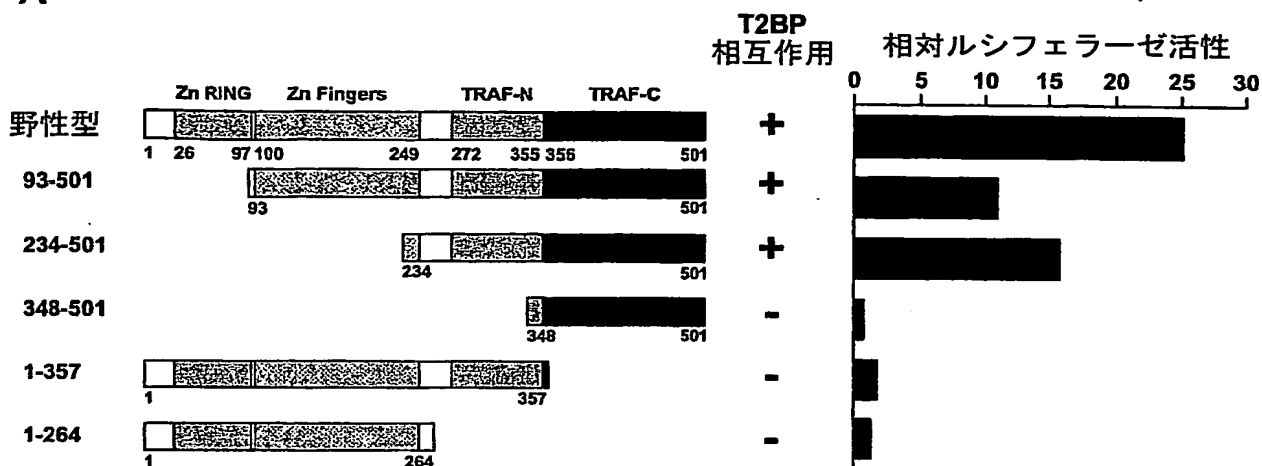
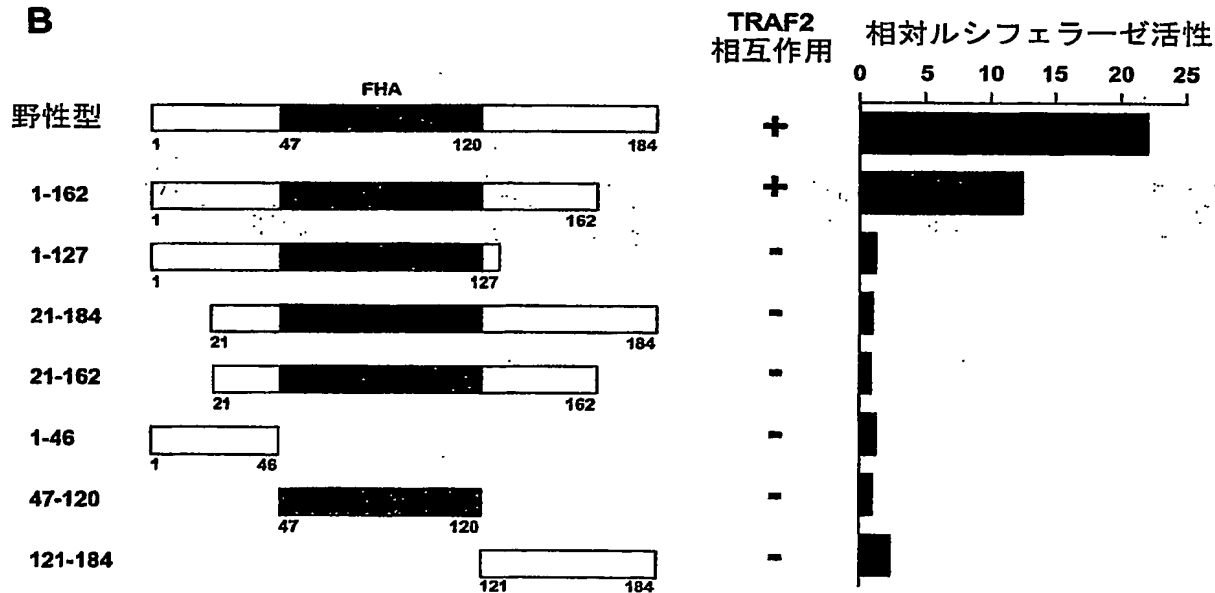
A**B**

図2

3/4

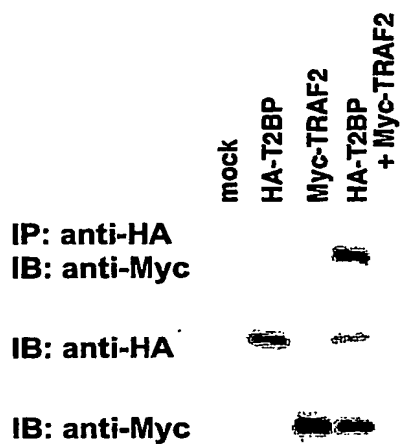


図3

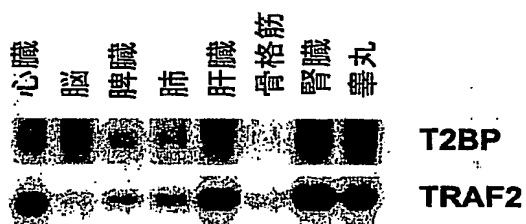


図4

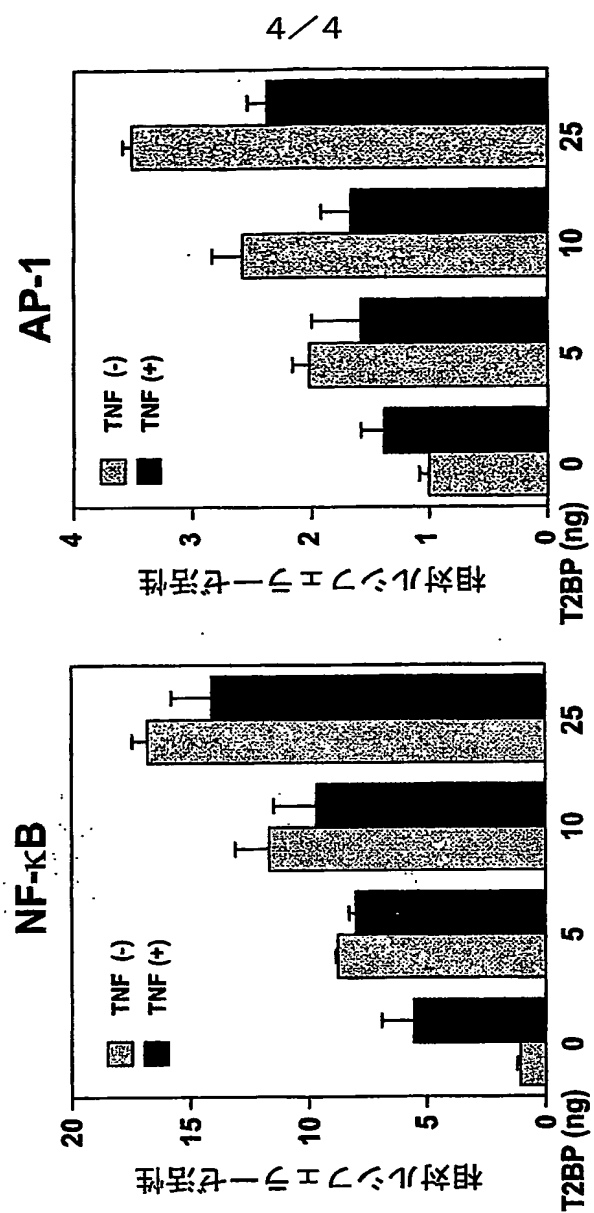


図5

1/12

配列表

SEQUENCE LISTING

<110> The Institute of Physical and Chemical Research and Kabushiki Kaisha
Dnaform

<120> Novel Polypeptide and Nucleic Acid Encoding the Same

<130> 02PF257-PCT

<160> 18

<210> 1

<211> 184

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Thr Ser Phe Glu Asp Ala Asp Thr Glu Glu Thr Val Thr Cys Leu

1 5 10 15

Gln Met Thr Val Tyr His Pro Gly Gln Leu Gln Cys Gly Ile Phe Gln

20 25 30

Ser Ile Ser Phe Asn Arg Glu Lys Leu Pro Ser Ser Glu Val Val Lys

35 40 45

Phe Gly Arg Asn Ser Asn Ile Cys His Tyr Thr Phe Gln Asp Lys Gln

50 55 60

Val Ser Arg Val Gln Phe Ser Leu Gln Leu Phe Lys Lys Phe Asn Ser

65 70 75 80

Ser Val Leu Ser Phe Glu Ile Lys Asn Met Ser Lys Lys Thr Asn Leu

85 90 95

Ile Val Asp Ser Arg Glu Leu Gly Tyr Leu Asn Lys Met Asp Leu Pro

100 105 110

Tyr Arg Cys Met Val Arg Phe Gly Glu Tyr Gln Phe Leu Met Glu Lys

115 120 125

2/12

Glu Asp Gly Glu Ser Leu Glu Phe Phe Glu Thr Gln Phe Ile Leu Ser

130

135

140

Pro Arg Ser Leu Leu Gln Glu Asn Asn Trp Pro Pro His Arg Pro Ile

145

150

155

160

Pro Glu Tyr Gly Thr Tyr Ser Leu Cys Ser Ser Gln Ser Ser Ser Pro

165

170

175

Thr Glu Met Asp Glu Asn Glu Ser

180

<210> 2

<211> 1613

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

ggcacgaggg agaggacgtg ctctgccagc cagtgggaag gcaggccgcg cgcgcgggag 60

cgcgggagga tcggcggtc gcggtcactg gtccctggct cggttccccg cccccgggg 120

ctcacactta cccgcgcgga ggagcagcgg cggggtgtcc acccccatcc tgcgccagct 180

ctcctcgatt cccctcgctc tgagccggga gagccgaaca gctgaagaga gttcactgac 240

tcccagccc caggtgggccc ttgtgcacat c atg acc agt ttt gaa gat gct 292

Met Thr Ser Phe Glu Asp Ala

1

5

gac aca gaa gag aca gta act tgt ctc cag atg acg gtt tac cat cct 340

Asp Thr Glu Glu Thr Val Thr Cys Leu Gln Met Thr Val Tyr His Pro

10

15

20

ggc cag ttg cag tgt gga ata ttt cag tca ata agt ttt aac aga gag 388

Gly Gln Leu Gln Cys Gly Ile Phe Gln Ser Ile Ser Phe Asn Arg Glu

25

30

35

aaa ctc cct tcc agc gaa gtg gtg aaa ttt ggc cga aat tcc aac atc 436

Lys Leu Pro Ser Ser Glu Val Val Lys Phe Gly Arg Asn Ser Asn Ile

3/12

40	45	50	55	
tgt cat tat act ttt cag gac aaa cag gtt tcc cga gtt cag ttt tct	484			
Cys His Tyr Thr Phe Gln Asp Lys Gln Val Ser Arg Val Gln Phe Ser				
60	65	70		
ctg cag ctg ttt aaa aaa ttc aac agc tca gtt ctc tcc ttt gaa ata	532			
Leu Gln Leu Phe Lys Lys Phe Asn Ser Ser Val Leu Ser Phe Glu Ile				
75	80	85		
aaa aat atg agt aaa aag acc aat ctg atc gtg gac agc aga gag ctg	580			
Lys Asn Met Ser Lys Lys Thr Asn Leu Ile Val Asp Ser Arg Glu Leu				
90	95	100		
ggc tac cta aat aaa atg gac ctg cca tac agg tgc atg gtc aga ttc	628			
Gly Tyr Leu Asn Lys Met Asp Leu Pro Tyr Arg Cys Met Val Arg Phe				
105	110	115		
gga gag tat cag ttt ctg atg gag aag gaa gat ggc gag tca ttg gaa	676			
Gly Glu Tyr Gln Phe Leu Met Glu Lys Glu Asp Gly Glu Ser Leu Glu				
120	125	130	135	
ttt ttt gag act caa ttt att tta tct cca aga tca ctc ttg caa gaa	724			
Phe Phe Glu Thr Gln Phe Ile Leu Ser Pro Arg Ser Leu Leu Gln Glu				
140	145	150		
aac aac tgg cca cca cac agg ccc ata ccg gag tat ggc act tac tcg	772			
Asn Asn Trp Pro Pro His Arg Pro Ile Pro Glu Tyr Gly Thr Tyr Ser				
155	160	165		
ctc tgc tcc tcc caa agc agt tct ccg aca gaa atg gat gaa aat gag	820			
Leu Cys Ser Ser Gln Ser Ser Ser Pro Thr Glu Met Asp Glu Asn Glu				
170	175	180		
tca tgaacacaga aagtctaaga ggagaaatat gatggatgaa gagctctgta	873			
Ser				
gatgctgtat agacactaaa taagagttga ttagggtagt atattatagt catctgttat				933

4/12

gctgtgaaat ttggaattca aaattttgaa gtctgtaaat tgtgttagtc attaaacttag 993
 tcacctgttg tattctggat ctacacaaaa ttattttaag tgctcttatt aatctgtgag 1053
 ·gattaatata caaaaagtat cctttgagat gaagtcgtgt tctcaaaata aggttatatt 1113
 attttctttt tctgcttgat ttatcatcttg tgttttgctt tgtttttgta aggaaccatc 1173
 tcttggtttg gtcacatcag ttacacaacag ccatttgttt tcaaggtcaa ggctccaggc 1233
 aggttggttac tgggtgtttgc agcctgtcag tacttgtagt actggaatag gttctaggct 1293
 agtgtctgcg cgtcactgtg gttttagcat gggaggactt atttgagaaa tactacotta 1353
 cttttctatg atttcttttt acagagttat agtgtgttta ctcctaagat gacagttctc 1413
 tttgtctata ttcagcatct aagacaaaata tttaaacatt ttaaagaacc actgtgttaa 1473
 gtttaggatt atttacttac caaattagaa gtttgacttt tatgtgttat acacaatctt 1533
 aaaatttcac gaattcacct ttttaatagt atccatgtac ataataaaat caaagtttaa 1593
 ttaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1613

<210> 3

<211> 184

<212> PRT

<213> mouse

<400> 3

Met	Ser	Thr	Phe	Glu	Asp	Ala	Asp	Thr	Glu	Glu	Thr	Val	Thr	Cys	Leu
1				5					10					15	
Gln	Met	Thr	Ile	Tyr	His	Pro	Gly	Gln	Gln	Ser	Gly	Ile	Phe	Lys	Ser
				20					25					30	
Ile	Arg	Phe	Cys	Ser	Lys	Glu	Lys	Phe	Pro	Ser	Ile	Glu	Val	Val	Lys
				35					40					45	
Phe	Gly	Arg	Asn	Ser	Asn	Met	Cys	Gln	Tyr	Thr	Phe	Gln	Asp	Lys	Gln
				50					55					60	
Val	Ser	Arg	Ile	Gln	Phe	Val	Leu	Gln	Pro	Phe	Lys	Gln	Phe	Asn	Ser
65				70					75					80	
Ser	Val	Leu	Ser	Phe	Glu	Ile	Lys	Asn	Met	Ser	Lys	Lys	Thr	Ser	Leu

5/12

	85		90		95
Met Val Asp Asn Gln Glu Leu Gly Tyr Leu Asn Lys Met Asp Leu Pro					
	100		105		110
Tyr Lys Cys Met Leu Arg Phe Gly Glu Tyr Gln Phe Leu Leu Gln Lys					
	115		120		125
Glu Asp Gly Glu Ser Val Glu Ser Phe Glu Thr Gln Phe Ile Met Ser					
	130		135		140
Ser Arg Pro Leu Leu Gln Glu Asn Asn Trp Pro Thr Gln Asn Pro Ile					
	145		150		155
Pro Glu Asp Gly Met Tyr Ser Ser Tyr Phe Thr His Arg Ser Ser Pro					
	165		170		175
Ser Glu Met Asp Glu Asn Glu Leu					
	180				

<210> 4

<211> 1970

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 4

gagttaggag cagcttgccc cgcgtgcgca gctgggttgt cagtgotgcg gtgtacctaa	60
cacaccgaca cagaccctc ttttttctcc caggagagga gacaaggctc aggagtctg	120
atctagctgt ggccactgga agactctcag gccggggagc gtc atg tcc acc ttt	175
Met Ser Thr Phe	
1	
gaa gac gct gat aca gag gag acg gtc act tgt ctc cag atg acc att	223
Glu Asp Ala Asp Thr Glu Glu Thr Val Thr Cys Leu Gln Met Thr Ile	
5 10 15 20	
tac cat cct ggc caa caa agt ggg ata ttt aaa tca ata agg ttt tgc	271
Tyr His Pro Gly Gln Gln Ser Gly Ile Phe Lys Ser Ile Arg Phe Cys	

6/12

25	30	35	
agc aaa gag aag ttt cct tcc att gaa gtg gtg aaa ttt gga cgc aat			319
Ser Lys Glu Lys Phe Pro Ser Ile Glu Val Val Lys Phe Gly Arg Asn			
40	45	50	
tcc aac atg tgc cag tat acg ttt cag gac aaa cag gtg tcc cga att			367
Ser Asn Met Cys Gln Tyr Thr Phe Gln Asp Lys Gln Val Ser Arg Ile			
55	60	65	
cag ttt gtt tta cag ccg ttt aaa cag ttc aac agc tcc gtt ctc tcg			415
Gln Phe Val Leu Gln Pro Phe Lys Gln Phe Asn Ser Ser Val Leu Ser			
70	75	80	
ttt gaa ata aaa aac atg agc aag aaa acc agt ttg atg gta gac aac			463
Phe Glu Ile Lys Asn Met Ser Lys Lys Thr Ser Leu Met Val Asp Asn			
85	90	95	100
cag gag ctc ggc tac ctc aat aaa atg gac ctg cct tac aag tgt atg			511
Gln Glu Leu Gly Tyr Leu Asn Lys Met Asp Leu Pro Tyr Lys Cys Met			
105	110	115	
ctc agg ttc gga gag tat cag ttc ctg ttg cag aag gaa gac gga gag			559
Leu Arg Phe Gly Glu Tyr Gln Phe Leu Leu Gln Lys Glu Asp Gly Glu			
120	125	130	
tcg gtg gaa tot ttt gag act caa ttt atc atg tot tca aga cct ctc			607
Ser Val Glu Ser Phe Glu Thr Gln Phe Ile Met Ser Ser Arg Pro Leu			
135	140	145	
ttg caa gaa aac aac tgg cca aca cag aat ccc ata cca gag gat ggg			655
Leu Gln Glu Asn Asn Trp Pro Thr Gln Asn Pro Ile Pro Glu Asp Gly			
150	155	160	
atg tat tot tca tac ttc acc cac aga agt tot cct tca gaa atg gat			703
Met Tyr Ser Ser Tyr Phe Thr His Arg Ser Ser Pro Ser Glu Met Asp			
165	170	175	180
gaa aac gaa ctg tgaagagggt ccaactggag acacattgaa ggatgaggac			755

7/12

Glu Asn Glu Leu

acatgggtcg gatgtcaaga gacatcctac ttccgagttt gtgagtgtag cgtagcgagg 815
ctgtcctcat gctgactttc gttttggtta tagcatttgg aagtctctag actgtgttaa 875
tcatcaactt agtcaactga gtttcggctc tacaaagaat taagtgtaca tctgtaaggg 935
ttggtgcac agacacgtct tctgggtaat gaggtcaccc ttgttgcttt tctgcatgat 995
gttaccoccca tgctttgtct tgggtggcagc catctcttgg ccgggtcaca tcatttcgta 1055
gcagoccttg tttttcaggt ttagagctcg ggcagattgc tcaactggtg ctgtggcgtg 1115
ctagcgcttg tagaactaga gtcctggaat aagttctaga gtgotgagtc actgagtcac 1175
catggcttcc ttatggaaag acttgggaaa tagctccttg attttcttcc tgtggaacgg 1235
tagtgtcgct ttccatatg taggacctac aacaaacatt taaagaacac tgagatgaag 1295
atggttttct tacaatattg aaagtgaatt ttatgtatct cacagattta aaaatggcag 1355
aaatcaaaaac ttttaacagc ctctttgcac atgataaagc cggagcccag ttcccttagtt 1415
gcttcttttg aacttcttaa aggaaaacat gtattcttaa aggaaaacat ctattcttag 1475
gctgcccctat agaagtcagt acctgtgaat atttatatta aatgottaat tatttctaaa 1535
attttagttt cacataaagt tgtatttatt taaaagatto tcattcactt ctttttggt 1595
agattaagat gaatgttagt gaacattatg taaaagagga tgaaagccat taagttaaga 1655
taaattctag cactactagt aagtaaggca cctgttatag ctccctctgt aatgaaatt 1715
taatgtgtga acaggtacag gattttgggt aggggaggag gtcagggtggg ggaagttagc 1775
cacattcata ttttgttttt gtttttggtt ttgtttttgt ttttgtttcc caacaatagc 1835
ttgctttgaa gtcaggctg gcttggaact cttgatcctc atacatcggc ccctgaatg 1895
ctgtgcctag cttaatgtaa ctgtatttct gcaacagccc ttgaaatta tttctaataa 1955
actgtttggc ctagt 1970

<210> 5

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

8/12

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 5

gaaggagccg ccaccatgtc cacctttgaa gacg

34

<210> 6

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 6

gaaggagccg ccaccatggc tgcagccagt gt

32

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 7

agcggataac aatttcacac aggaaa

26

<210> 8

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 8

9/12

gtttcctgtg tgaaattggt atccgctgca gacatgataa gatacattg 49

<210> 9

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 9

agcaagtcca gcctggttaa gatccttato gattttacca c 41

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 10

ccaatatgac cgccatgttg gc 22

<210> 11

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 11

catggtggcg gctccttcog gcgatacagt caactg 36

10/12

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 12

ccaatatgac cgccatgttg gc

22

<210> 13

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 13

catggtggcg gctccttcaa gtgcacggat ccctggc

37

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 14

gccatgttgg cattgattat tgac

24

<210> 15

<211> 21

11/12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 15

agcaagttca gcctggttaa g

21

<210> 16

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 16

gacgcgtcga ccatgtccac ctttgaagac g

31

<210> 17

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 17

gacgcgtcga ccatggctgc agccagtgt

29

<210> 18

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

12/12

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 18

ccggttaagc ggccgcagcg gataacaatt tcacacagga aac

43

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/00522

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K14/47, C12N15/12, C12N5/10, C12N1/15, C12N1/19,
C12N1/21, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K14/47, C12N15/12, C12N5/10, C12N1/15, C12N1/19,
C12N1/21, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/55350 A1 (Human Genome Sciences, Inc.), 21 September, 2000 (21.09.00), Seq. 1294 & EP 1163358 A1	1-26
P, X	WO 02/057449 A1 (Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.), 25 July, 2002 (25.07.02), Figs. 4 to 5 (Family: none)	1-26
P, X	WO 02/053737 A1 (Asahi Kasei Corp.), 11 July, 2002 (11.07.02), Seq. 81 (Family: none)	1-26

☐

Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
04 April, 2003 (04.04.03)

Date of mailing of the international search report
22 April, 2003 (22.04.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. 7 C07K14/47, C12N15/12, C12N5/10, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12Q1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. 7 C07K14/47, C12N15/12, C12N5/10, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 00/55350 A1 (Human Genome Sciences, Inc.) 2000.09.21, Seq. 1294 & EP 1163358 A1	1-26
P X	WO 02/057449 A1 (持田製薬株式会社) 2002.07.25, Fig. 4-5 (ファミリーなし)	1-26
P X	WO 02/053737 A1 (旭化成株式会社) 2002.07.11, seq 81 (ファミリーなし)	1-26

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.04.03

国際調査報告の発送日

22.04.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

4N

3126

電話番号 03-3581-1101 内線 3448